

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720090153580

UDC _____

厦门大学

博士学位论文

WNT 信号-OVOL2 负反馈调节环在结直肠癌进展中的作用研究

Study of the negative feedback loop of OVOL2 on WNT
signaling in colorectal cancer progression

叶国栋

指导教师姓名: 李博安 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2015 年 8 月

论文答辩时间: 2015 年 9 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 9 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要.....	- 1 -
Abstract	- 3 -
前言.....	- 5 -
1. EMT 与肿瘤的侵袭转移.....	- 5 -
2. Wnt 信号通路与 EMT.....	- 5 -
3. ovo 基因与 OV0 蛋白.....	- 7 -
4. 本课题研究思路.....	- 10 -
第一章 OVOL2 在结直肠癌中表达水平的检测和功能研究	- 11 -
第一节 引言.....	- 11 -
第二节 结果.....	- 11 -
一、结直肠癌细胞系和肿瘤标本中 OVOL2 表达水平检测.....	- 11 -
二、肿瘤标本公共数据库中 OVOL2 在结直肠癌中的表达状况.....	- 12 -
三、结直肠癌组织标本中 OVOL2 表达水平与病理因素的关联分析.....	- 13 -
第三节 小结与讨论.....	- 16 -
第二章 OVOL2 对结直肠癌转移、侵袭以及增殖能力的影响	- 17 -
第一节 引言.....	- 17 -
第二节 结果.....	- 17 -
一、OVOL2 蛋白对结直肠癌细胞增殖的影响.....	- 17 -
二、OVOL2 蛋白对结直肠癌细胞转移和侵袭能力的影响.....	- 18 -
第三节 小结与讨论.....	- 24 -
第三章 OVOL2 通过对上皮间质转化（EMT）的抑制来阻止结直肠癌进展	- 25 -
第一节 引言.....	- 25 -
第二节 结果.....	- 25 -
一、肿瘤标本公共数据库中 OVOL2 在肿瘤细胞系中共表达的基因分析.....	- 25 -

二、结直肠癌组织标本中 E-Cadherin 蛋白表达水平检测及与 OVOL2 蛋白表达相关性分析	- 27 -
三、结直肠癌细胞中 OVOL2 蛋白过表达或敲减对 EMT 标志物表达的影响	- 29 -
第三节 小结与讨论	- 31 -
第四章 抑制结直肠癌进展过程中 SLUG 是 OVOL2 的主要靶向蛋白	- 32 -
第一节 引言	- 32 -
第二节 结果	- 32 -
一、PCR 阵列法筛查 OVOL2 调控的靶向蛋白	- 32 -
二、免疫印迹和 RT-PCR 实验排查确认 OVOL2 的靶向蛋白	- 36 -
三、回补实验验证 SLUG 是 OVOL2 抑制结直肠 EMT 过程中的主要靶点	- 38 -
四、荧光素酶报告基因法验证排查 OVOL2 对 SLUG 的直接调控作用 ...	- 39 -
第三节 小结与讨论	- 41 -
第五章 OVOL2 蛋白通过抑制经典 WNT 信号活力来抑制 SLUG 基因转录水平	- 42 -
第一节 引言	- 42 -
第二节 结果	- 42 -
一、荧光素酶报告基因实验检测 OVOL2 蛋白对 WNT 信号活力的影响	- 42 -
二、OVOL2 蛋白不影响 β -Catenin 基因的转录和蛋白表达量	- 43 -
三、OVOL2 蛋白能够和 β -Catenin 及 TCF4 蛋白结合	- 43 -
四、OVOL2 蛋白不影响 β -Catenin 与 TCF4 蛋白之间的结合能力	- 47 -
五、OVOL2 不影响 TCF4 结合 DNA 上 TBE 位点的能力	- 48 -
第三节 小结与讨论	- 49 -
第六章 OVOL2 通过募集 HDAC1 到 β-Catenin-TCF4 复合体上来抑制 WNT 信号活性	- 50 -
第一节 引言	- 50 -
第二节 结果	- 50 -
一、两步法免疫共沉淀技术确认 OVOL2- β -Catenin-TCF4 三者之间关系	- 50 -

二、免疫共沉淀法检测 OVOL2 与 HDAC1 间是否存在相互结合作用	51 -
三、OVOL2-HDAC1-TCF4 或 OVOL2-HDAC1- β -Catenin 能形成三蛋白复合物	52 -
四、OVOL2 蛋白的存在或表达增强能够影响 HDAC1 结合 TCF4 或 β -Catenin 蛋白的能力.....	53 -
五、HDAC 活力的丧失能够回补 OVOL2 蛋白抑制靶基因转录活性的作用	54 -
六、OVOL2 蛋白能够加强 WNT 靶基因上的去乙酰化效果.....	55 -
七、OVOL2 蛋白能够加强 HDAC1 结合到 WNT 靶基因启动子上的能力	55 -
八、染色质免疫共沉淀检测不同蛋白在 SLUG 基因启动子上结合能力的变化.....	56 -
第三节 小结与讨论.....	58 -
第七章 OVOL2 是 WNT 信号通路的直接靶基因	59 -
第一节 引言	59 -
第二节 结果.....	59 -
一、结直肠癌细胞系中 β -Catenin 蛋白能够调控 OVOL2 的表达量	59 -
二、染色质免疫共沉淀实验证实 OVOL2 是 WNT 信号通路的直接靶基因	60 -
三、荧光素酶报告基因实验进一步验证 WNT 信号对 OVOL2 基因的调控	60 -
四、结直肠细胞 SW620 和 HCT116 中 OVOL2 基因不受 β -Catenin 蛋白的调控.....	62 -
五、免疫组织化学法检测结直肠癌肿瘤标本中 β -Catenin 和 OVOL2 的表达相关性	63 -
六、WNT 信号-OVOL2 负反馈环作用的提出.....	63 -
第三节 小结与讨论.....	65 -
第八章 基因启动子区域的甲基化导致结直肠癌进展后期 OVOL2 的低表达.....	66 -
第一节 引言	66 -
第二节 结果.....	66 -
一、OVOL2 基因启动子区域 CpG 岛的预测分析与引物设计	66 -

二、结直肠癌细胞和肿瘤标本中 OVOL2 基因 CpG 岛甲基化程度及其与 OVOL2、SLUG 表达量之间的相关性分析	- 67 -
三、亚硫酸盐测序法检测结直肠癌细胞中 OVOL2 基因 CpG 岛甲基化程度	- 69 -
四、5-Aza-dC 处理不同结直肠癌细胞后 OVOL2 表达情况的变化	- 70 -
五、验证 CpG 岛甲基化的存在使 OVOL2 启动子失去对 WNT 信号响应的能力	- 71 -
第三节 小结与讨论	- 71 -
讨论	- 73 -
材料与方法	78
1. 常用药品、试剂及溶液配方	78
2. 核酸相关实验	82
3. 蛋白相关实验	94
4. 细胞实验	104
5. 肿瘤标本实验	109
参考文献	114
在学期间发表论文	117
致谢	118

Table of Content

Abstract (In Chinese)	- 1 -
Abstract	- 3 -
Introduction	- 5 -
1. EMT and tumor metastasis	- 5 -
2. Wnt sinaling and EMT	- 5 -
3. Ovo gene and OVO protein	- 7 -
4. Sigantificance of this projects	- 10 -
Chapter 1 OVOL2 protein levels in colorectal cancer	- 11 -
Segment 1 Foreword	- 11 -
Segment 2 Results	- 11 -
Segment 3 Conclusions	- 16 -
Chapter 2 Effects of OVOL2 on proliferation and metastasis of CRC	- 17 -
Segment 1 Foreword	- 17 -
Segment 2 Results	- 17 -
Segment 3 Conclusions	- 24 -
Chapter 3 OVOL2 suppresses the progression of CRC by inhibiting EMT	- 25 -
Segment 1 Foreword	- 25 -
Segment 2 Results	- 25 -
Segment 3 Conclusions	- 31 -
Chapter 4 SLUG is a major target of OVOL2 in CRC	- 32 -
Segment 1 Foreword	- 32 -
Segment 2 Results	- 32 -
Segment 3 Conclusions	- 41 -

Chapter 5 OVOL2 suppresses transcription of SLUG by inhibition of WNT signaling	- 42 -
Segment 1 Foreword	- 42 -
Segment 2 Results	- 42 -
Segment 3 Conclusions	- 49 -
Chapter 6 OVOL2 recruits HDAC1 to the complex of β-Catenin-TCF4	- 50 -
Segment 1 Foreword	- 50 -
Segment 2 Results	- 50 -
Segment 3 Conclusions	- 58 -
Chapter 7 OVOL2 is a direct target gene of WNT signaling	- 59 -
Segment 1 Foreword	- 59 -
Segment 2 Results	- 59 -
Segment 3 Conclusions	- 65 -
Chapter 8 Methylation of OVOL2 promoter	- 66 -
Segment 1 Foreword	- 66 -
Segment 2 Results	- 66 -
Segment 3 Conclusions	- 71 -
Discussion	- 73 -
Materials and methods	78
1. Materials and recipes	78
2. Methods of nucleic acid research	82
3. Methods of protein research	94
4. Methods of cell research	104
5. Methods of mouse and tumor tissue research.....	109
References	114

Table of Content

Publications 117

Acknowledgement 118

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

背景与目的: 激活的 Wnt 信号通路能够促进多种癌细胞的侵袭,而在结直肠癌 (CRC) 的进展中 WNT 信号通路参与与否及其参与的机制均知之甚少。OVOL2 是 Ovo 家族成员之一,是由 WNT 信号通路调控的,具有保守锌指结构的转录因子。该课题主要研究了 OVOL2 在肠道肿瘤中的表达和功能,及其协同 WNT 信号通路在肠道肿瘤进展中的作用。

方法: 利用免疫印迹法和实时荧光定量 PCR,检测七种结直肠癌细胞中 OVOL2 蛋白的表达及其 mRNA 的水平;利用免疫组织化学 (IHC) 方法,检测 OVOL2 在结直肠癌组织芯片中的表达;临床上获取 50 例结直肠癌病人的手术标本,用以 DNA 甲基化和 mRNA 水平的检测。慢病毒感染结肠癌细胞株 SW620,用于过表达 OVOL2,在细胞水平上检测其转移和侵袭的能力;并将该细胞及对照组注射至裸鼠体内,用以评估肿瘤的生长和侵袭能力。采用液相二级质谱的方法,分析细胞株中由串联亲和纯化所得的 OVOL2 结合复合体,并应用免疫共沉淀法加以验证。利用荧光素酶报告系统检测基因启动子的活性。

结果: 在 Oncomine 数据库中分析患者的数据,结肠腺瘤 (adenomas) 中 OVOL2 的 mRNA 水平明显低于结肠癌 (carcinomas),且结肠癌中分化等级由 Grade2 到 Grade4 的进展中,OVOL2 的表达量显著降低。在含 275 例结直肠癌的组织芯片中,免疫组化检测的结果表明,OVOL2 的表达量与肿瘤分期(stage)呈负相关趋势。在过表达 OVOL2 的 SW620 细胞中,其迁移、侵袭和上皮间质转化 (EMT) 的能力显著下降,且其在裸鼠移植肿瘤中的侵袭现象也被完全消失;与之相反地,在敲减 OVOL2 的 LS174T 细胞中,出现了上皮向间质化的转化表型。通过一系列的体外实验证实,OVOL2 蛋白与 T 细胞因子 (TCF4) 和 β -连环蛋白 (β -Catenin) 复合体间存在相互结合的能力,其通过募集去乙酰化酶 (HDAC1) 至 TCF4- β -连环蛋白复合物上,来抑制 WNT 靶向的 EMT 相关基因的转录,如 *SLUG* 基因等。多种实验结果也证实了,OVOL2 基因是 WNT 信号通路的下游靶基因。细胞系和结直肠癌病人标本的检测研究表明,癌症进展的晚期,OVOL2 基因的启动子存在甲基化现象,从而导致 OVOL2 基因转录的下调,并失去其对 WNT 信号通路的抑制作用。

结论: OVOL2 是结直肠癌进展过程的抑制因子,其通过募集 HDAC1 至 TCF4-

β -catenin 复合体上的能力来抑制 WNT 活力，从而与 WNT 信号间形成一个负反馈调节环。提高病人 OVOL2 的表达量有望阻止结直肠癌的进展和转移过程。

关键词：小鼠模型；结肠癌；信号转导。

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Background & Aims: Activation of WNT signaling promotes the invasive activities of several types of cancer cells, but little it is not clear if it regulates the same processes in colorectal cancer (CRC) cells, or what mechanisms are involved. We studied the expression and function of OVOL2, a member of the Ovo family of conserved zinc-finger transcription factors regulated by the WNT signaling pathway, in intestinal tumors.

Methods: We analyzed expression of OVOL2 protein and mRNA in CRC cell lines and tissue arrays, as well as CRC samples from patients who underwent surgery at Xiamen University in China from 2009 to 2012; clinical information was also collected. CRC cell lines (SW620) were infected with lentivirus expressing OVOL2, analyzed in migration and invasion assays, and injected into nude mice to assess tumor growth and metastasis. Tandem affinity purification was used to purify the OVOL2-containing complex from CRC cells; the complex was analyzed in liquid chromatography and tandem mass spectrometry and immunoprecipitation experiments. Gene promoter activities were measured in luciferase reporter assays.

Results: Analysis of data from patients indicated that the levels of *OVOL2* mRNA were significantly lower in colon carcinomas than adenomas, and decreased significantly as carcinomas progressed from grades 2 to 4. Immunohistochemical analysis of a tissue array of 275 CRC samples showed a negative association between tumor stage and OVOL2 level. Overexpression of OVOL2 in SW620 cells decreased their migration and invasion, reduced markers of the epithelial to mesenchymal transition (EMT), and suppressed their metastasis as xenograft tumors in nude mice; knockdown of OVOL2 caused LS174T cells to transition from epithelial to mesenchymal phenotypes. OVOL2 was found to bind TCF4 and β -catenin, facilitating recruitment of HDAC1 to the TCF4– β -catenin complex; this inhibited expression of EMT-related genes regulated by WNT, such as *SLUG*, in CRC cell lines. *OVOL2* was a downstream target of WNT signaling in LS174T and SW480 cells. The *OVOL2* promoter was hypermethylated in late-stage CRC specimens from patients and in SW620 cells; hypermethylation resulted in

OVOL2 down-regulation and inability to inhibit WNT signaling.

Conclusions: *OVOL2* is a colorectal tumor suppressor that blocks WNT signaling by facilitating recruitment of HDAC1 to the TCF4- β -catenin complex. Strategies to increase levels of *OVOL2* might be developed to reduce colorectal tumor progression and metastasis.

KEYWORDS: mouse model; colon cancer; signal transduction.

厦门大学博硕士论文摘要库

前言

1. EMT 与肿瘤的侵袭转移

肿瘤的侵袭转移是一个复杂的过程,包括局部侵袭、内渗、转运、外渗、微转移形成以及定位等几个阶段^[1, 2]。其中,局部侵袭和内渗是侵袭转移的起始限速步骤,对于肿瘤最终能否形成转移灶起到关键作用。局部侵袭过程以上皮-间质转化(Epithelial- Mesenchymal Transition, EMT)为代表^[3]。

长期以来,人们都认为上皮细胞是终末分化细胞,仅在体内发挥支持保护以及分泌等作用。上皮细胞具有非常典型的顶面-底面极性,细胞间的紧密连接、桥粒和黏附连接使很多上皮细胞作为一个整体发挥功能,同时也限制了细胞任意迁移的能力。近些年的发现表明,上皮细胞在某些因素的作用下,失去细胞极性以及细胞间的紧密连接和黏附连接,由多边形上皮样细胞变为梭形的纤维细胞样形态,获得了浸润性和游走迁移能力,转变成具备间质细胞形态和特性的细胞,这种变化被定义为上皮-间质转化。EMT 以上皮细胞极性的丧失及其间质特性的获得为主要特征,EMT 是肿瘤获得局部侵袭能力的关键性事件^[4]。发生 EMT 的细胞会发生一些标志性的改变,包括 E-cadherin 的减少或丢失^[5]、ZO-1 的丢失和重定位^[6],以及间质细胞来源蛋白质如 Vimentin、N-cadherin、Fibronectin 等的重新表达或表达水平增加,而这些蛋白质的表达改变与肿瘤的侵袭、转移密切相关^[7]。此外,EMT 还能使肿瘤与细胞外基质相互作用,细胞外基质成分不仅促使肿瘤细胞发生 EMT,发生 EMT 的细胞也能通过控制诸如 MMP 家族基因的表达来改变细胞外基质的组成,便于肿瘤浸润和转移^[8-11]。

EMT 具有精确的细胞内外信号调控机制,通过信号转导活化不同的核内转录因子,最终调节基因表达过程。参与这一过程的信号转导途径主要包括: TGF β 信号通路、Wnt 信号通路、Notch 信号通路、Shh 信号通路、多种生长因子相关途径以及一些应激(Stress)信号刺激,最终发挥作用的核内转录因子主要包括 Snail1 (Snail)、Snail2(Slug), Twist1 (Twist), EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2, 以及 E47 等,这些转录因子可以直接或间接抑制 E-cadherin 的表达,从而产生 EMT 表型^[12]。

2. Wnt 信号通路与 EMT

Wnt 信号通路是一条十分保守的传导通路,在胚胎发育过程及多种肿瘤的发生发展过程中起重要作用^[13, 14]。Wnt 信号通路的激活有赖于细胞内一系列信号分子的相互作用,其中起关键作用的是 β -catenin。在无信号刺激时,新形成的 β -catenin 在胞浆内会很快被降解,从而保持细胞的静息状态。对 β -catenin 起降解作用的是由 Axin, GSK3 和 APC 三种蛋白组成的复合体,该复合体可使 β -catenin N 端 ser 和 thr 磷酸化,最后在泛素化作用下被蛋白酶体(Proteasome)降解。当 Wnt 蛋白作为配体与受体 Frizzled/LPR 复合物结合时,磷酸化并激活胞浆蛋白 Dishevelled(Dsh),Dsh 抑制 Axin,GSK3 和 APC 复合物的功能,使 β -catenin 不被降解,得以在胞浆内聚集,最后转位至细胞核,与 DNA 结合蛋白 LEF1/TCF 结合,发挥转录因子作用^[15]。

在 EMT 相关的转录因子中,Slug 已经被证明是 Wnt 信号的直接正向靶基因^[16],而 Wnt 信号可以通过另外一个直接正向靶基因 Axin2 调节 GSK3 β 的核-浆转运,使 GSK3 β 不能有效磷酸化降解 Snail 而在蛋白水平上调 Snail 的表达^[17]。Twist 在某些组织也接受 Wnt 信号的上调,然而这种调节是间接的^[18]。除了在核内作为转录因子影响基因表达而介导间质表型外, β -catenin 在细胞膜上与 E-cadherin、 α -cadherin 等构成连接复合体,再与肌动蛋白骨架相连,促进细胞间黏附而介导上皮表型^[19]。因此, β -catenin 具有双重功能,但调节 β -catenin 转录与细胞间粘附转换的机制仍然不清楚。最近一项研究表明,机体可以通过一种滞留机制(retention mechanism)介导 β -catenin 的核浆分布。在这里 LEF1/TCF 以及 BCL9/Pygo2 将 β -catenin 保留在核内,而 APC 和 Axin 则把 β -catenin 保留在浆内^[20]。Wnt 信号在许多肿瘤内调节 EMT^[21-25],但其下游的分子机制在不同肿瘤内会各有不同,这反映了细胞背景(context)依赖性与肿瘤组织特异性,即各种不同组织特异性表达的因子可以调节 Wnt 信号输出。反映在结直肠癌内尤为明显,与乳腺癌、肺癌^[26, 27]等其它肿瘤内明显不同的是,临床标本和细胞系中的实验表明,大多数早期结直肠癌都已经存在 APC 或者 β -catenin 的突变导致的 Wnt 信号异常激活^[28-30],但肿瘤此时并不发生侵袭转移,因此结肠癌内一定存在一种机制调节 Wnt 信号的输出,只有在肿瘤进展时这种机制异常才导致肿瘤侵袭转移。另外一个重要的佐证是 APC 突变的肠肿瘤模型 APCmin 小鼠,该模型由于 Wnt 信号异常激活引发肠道腺瘤,但绝不发生侵袭转移^[31]。正因为如此,目前

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.